

取扱説明書：KANEKA DNA Chromatography MABC/*erm*(41)

使用上の注意事項

- 本製品は保護具（ゴム手袋や保護メガネ、マスク等）を着用の上、ご使用ください。
- 本製品で得られた結果の判断・利用については、お客様の責任のもと実施してください。結果の判断・利用によって生じた損害や損失について、当社は直接・間接を問わず一切の責任を負いません。
- 本使用説明書に記載のない操作手順で実施して得られた検出結果の妥当性はお客様にて検証してください。
- 本製品は研究用試薬であり、疾病の診断またはその補助の目的で使用することはできません。

1. 本製品の概要

本製品は、マルチプレックス PCR 法と核酸クロマト法に基づき、菌懸濁液または菌培養液から *Mycobacteroides abscessus* complex (MABC) の3亜種 (*M. abscessus* subsp. *abscessus* 【*M. abscessus*】, *M. abscessus* subsp. *bolletii* 【*M. bolletii*】, *M. abscessus* subsp. *massiliense* 【*M. massiliense*】) と、*erm*(41)に関する2種類の遺伝子型 (T28C, full-length^{※1}) を同定するための製品 (研究用試薬) です。

※1. T28C株：*erm*(41)の28位がCである株。full-length：*erm*(41)遺伝子を部分欠損 (典型的には64–65位および159–432位の欠損) なく全長保持する株。尚、本製品は国立感染症研究所の星野仁彦室長と株式会社カネカの共同開発品で、検出性能はEBioMedicine. 2021 Feb;64:103187で公表されております。

2. キット構成/保存条件

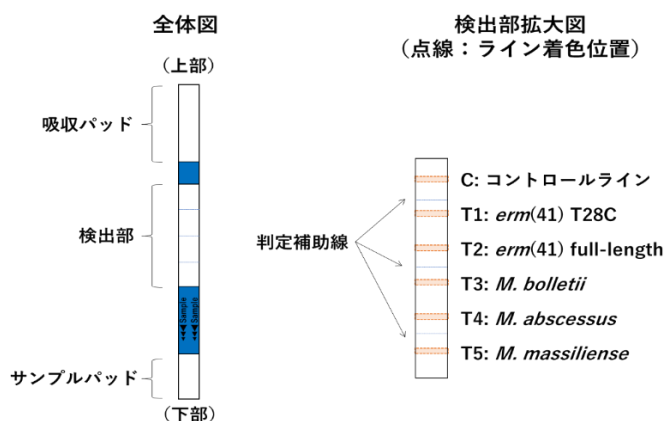
構成部材	容量 (20テスト)	保管温度	使用期限
Test Strip	20本	2~30°C	ラベルに記載
Detection Buffer	3.2 mL×1本		
Results Card	20枚		
PCR Mix ^{※2}	200 μL×1本	-20°C以下	
Primer Mix	100 μL×1本		

※2. 耐熱性 DNA Polymerase、dNTPs、dUTP、UNG (Uracil DNA Glycosylase) を含みます。

3. 検出原理

各項目を特異的に増幅するプライマーセットを用いて、マルチプレックス PCR により各項目に特異的に保存された DNA 領域を増幅します。増幅産物を Test Strip に展開し、ライン着色パターンから MABC 亜種および *erm*(41)の遺伝子型を判定します。ライン着色を目視にて確認するため、結果判定に装置 (ゲル撮像装置、リアルタイム PCR 装置等) は不要です。

< Test Strip 各部の名称 >



4. 使用方法

4.1. 本製品以外に必要な器具・機器等

- ・ マイクロピペットおよびマイクロピペット用フィルター付きチップ
- ・ サーマルサイクラー（推奨機器：LifeECO Thermal Cycler / Bioer Technology 社）
- ・ ヒートブロック（サーマルサイクラーで代用可能）
- ・ 0.2 mL チューブ
- ・ 卓上遠心機
- ・ KANEKA Microbial DNA Extraction Reagent（別売）

4.2. DNA 抽出液の調製

適用可能な検体

固形培地又は液体培地で培養を行った培養物の懸濁液又は培養液。

- ・ McFarland No.1 相当（ 10^8 cfu/mL 程度）もしくは培養陽性となった液体培地
- ・ コロニーを滅菌蒸留水にて McFarland No.1 相当となるよう調製した菌懸濁液

DNA 抽出試薬

「KANEKA Microbial DNA Extraction Reagent」（別売）

<液体培地の場合>

- ① McFarland No. 1相当の液体培地20 μ Lを0.2 mLチューブに移し、KANEKA Microbial DNA Extraction Reagent のSolution A 20 μ Lと混合後、ヒートブロックもしくはサーマルサイクラーにて98 $^{\circ}$ C/10分間加熱する。
- ② 室温まで冷却後、KANEKA Microbial DNA Extraction ReagentのSolution B 80 μ Lを添加し、ピペティングする。

<コロニーの場合>

- ① コロニーを滅菌蒸留水に懸濁し^{※3}、McFarland No. 1相当となるように調製する。
- ② 菌懸濁液20 μ Lを0.2 mLチューブに移し、KANEKA Microbial DNA Extraction Reagent のSolution A 20 μ Lと混合後、ヒートブロックもしくはサーマルサイクラーにて98 $^{\circ}$ C/10分間加熱する。
- ③ 室温まで冷却後、KANEKA Microbial DNA Extraction Reagent のSolution B 80 μ Lを添加

し、ピペッティングする。

※3. コロニーは、固形培地を一緒に掻き取らないように採取してください。

4.3. PCR 反応液の調製

- ① PCR Mix と Primer Mix を予め解凍する※4。
- ② マスターミックス調製用の 0.2 mL チューブに PCR Mix 10 μ L と Primer Mix 5 μ L の割合で、必要数分を分注・混合し、マスターミックスを調製する。
- ③ 新しい 0.2 mL チューブに、4.2.で調製した DNA 抽出液 5 μ L を添加する。
- ④ ③の 0.2 mL チューブに、マスターミックス 15 μ L を添加しピペッティングで混合する※5。

※4. PCR Mix および Primer Mix は、分注前に十分に混合してください。特に PCR Mix は融解後に白色の沈殿を認める場合がございますが、完全に溶解してご使用ください。

※5. 調製後、酵素の失活や非特異的な増幅反応を防ぐため、氷上など温度が上がらない場所においてください。

4.4. PCR 反応

サーマルサイクラーに、0.2 mL チューブをセットして以下 PCR 条件にて増幅反応を行う。

<PCR 条件>

温度 (°C)	時間 (秒)	サイクル
25	300	1
94	60	1
94	5	35
65	10	
72	15	

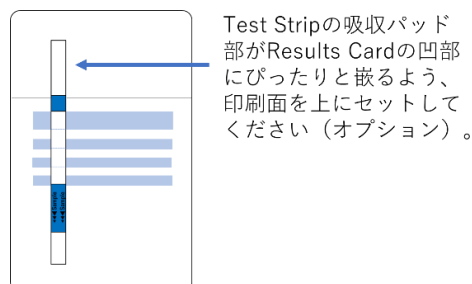
4.5. Test Strip による検出※6

- ① Results Card に Test Strip をセットする (オプション) ※7。
- ② 反応終了後の PCR 用チューブを取り出し、蓋を開け、5 μ L の増幅産物を分取し、Test Strip のサンプルパッド部に添加する※8。
- ③ Detection Buffer 70 μ L を同様にサンプルパッド部に添加する。
- ④ 展開 10 分時点で、目視にてライン着色パターンを確認し、判定する。

※6. Test Strip を扱う際は、ゴム手袋等を着用し、必ず上部の吸収パッドを持つようにしてください。

Test Strip のサンプルパッド部や検出部には直接手を触れないでください。

※7. このステップは省略することが可能です。Results Card に Test Strip を載せ検出することで、ライン着色パターンの判定を補助します。必要に応じ下図のようにセットしてご使用ください。



※8. Test Strip に増幅産物を添加する際は、PCR 反応液の飛散による汚染に十分ご注意ください。展開時の環境温度が著しく低い場合（冬の屋外など）、ライン着色が薄くなる場合がありますので、15°C以上に空調された屋内にてご使用ください。

5. 結果判定

陰性：コントロールライン（C）のみが着色する。

陽性：コントロールライン（C）に加えて、検出ライン（T1～T5）が着色する。

無効：コントロールライン（C）が着色しない※9。

判定例	陰性	陽性 ※10				無効（一例）	
		<i>M. abscessus</i> <i>erm</i> (41) [full, T28C]	<i>M. abscessus</i> <i>erm</i> (41) [full, T28]	<i>M. bolletii</i> <i>erm</i> (41) [full, T28]	<i>M. massiliense</i> <i>erm</i> (41) [truncation, T28]	C なし	
着色 パターン	Cのみ	C+T1,2,4	C+T2,4	C+T2,3	C+T5	Cなし	Cなし

※9. コントロールラインは常時、着色します。コントロールラインが着色しない場合は増幅反応が正常に進行していない可能性がありますので、再試験を実施してください。

※10. 典型的な着色パターンの例です。*erm*(41) [full]：*erm*(41)遺伝子を部分欠損なく全長保持する株。*erm*(41)[truncation]：部分欠損（典型的には64-65位および159-432位の欠損）した*erm*(41)を有する株。

6. 使用上の注意事項

- 本取扱説明書に記載する保存条件、使用期限を厳守してください。
- 本製品は保護具（保護手袋や保護メガネ、マスク等）を着用の上、ご使用ください。
- 本製品の仕様は予告なく変更になる場合があります。
- 器具や機器、試薬類については、各々の製造元・販売元が指定する使用方法に従ってください。
- 本製品で得られた結果の判断や利用については、お客様の責任のもと実施してください。結果の判断や利用によって生じた損害や損失について、当社は直接・間接を問わず一切の責任を負いません。
- 本取扱説明書に記載のない操作手順や各々の検体における検出結果の妥当性についてはお客様にて検証してください。
- Test Strip は湿気を含む状態で長時間放置すると検出性能が低下する恐れがありますので、開封後は

容器の蓋をしっかりと閉じて保管し、吸湿には十分ご注意ください。

- コンタミネーションによる誤判定を防ぐため、使用するマイクロピペット用チップは 1 回毎に交換してください。また、マイクロピペット用チップはフィルター付きのものを使用してください。
- DNA 抽出、PCR 反応液の調製、Test Strip による検出の各ステップは、別々の実験室で実施することを推奨しております。別々の実験室での実施が難しい場合、同一実験室内で作業台を分離する、または、作業エリアを分離してください。
- 試薬や抽出 DNA 等チューブを開ける前に、卓上遠心機等でスピンドウンを行ってください。（内容物の飛散や、蓋についた試薬等が手指に付着するのを避けるため）
- マイクロピペット等、使用する器具・装置等は、定期的に 0.1%次亜塩素酸ナトリウムや市販の DNA 除去剤で清浄してください。
- コンタミネーションが発生した場合は、0.55%次亜塩素酸ナトリウム（又は市販の DNA 除去剤）もしくは UV 照射等で除染を行ってください。
- 使用後の Test Strip ならびに増幅反応液を廃棄する際は、検出部等に触れないように注意し、ビニール袋等に入れて廃棄してください。
- DNA 抽出後の試料を廃棄する場合は、当該地域の廃棄物に関する規定、および、当該施設の規則に従い、衛生面、環境面に配慮し廃棄してください。
- 本製品は Bioer Technology 社 LifeECO Thermal Cycler において最適化されております。他機種をご利用の場合には、結果が不鮮明になる可能性があります。
- 本製品は研究用試薬であり、疾病の診断若しくはその補助の目的で使用することはできません。

<問い合わせ先>

株式会社カネカ お問い合わせ窓口

TEL 079-445-2406（お問い合わせ受付時間：平日 9:00～17:00）

URL <https://www.kaneka-labtest.com>